

? S PN=EP 1084705

S7 1 PN=EP 1084705

? T 7/3,AB/1

7/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011551244

WPI Acc No: 1997-527725/199749

XRAM Acc No: C97-168100

**Medical use of dipeptidyl peptidase IV inhibitors - for lowering blood sugar levels**

Patent Assignee: PROBIODRUG GES ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH (PROB-N); KNOELL INST NATURSTOFF FORSCHUNG EV HANS (KNOE-N); BIOLOGICAL DRUG REAGENTS PHARM RES CO (BIOL-N); KNOELL INST NATURSTOFF FORSCH EV HANS (KNOE-N); PROBIODRUG AG (PROB-N); PROBIODRUG GMBH (PROB-N); PROBIODRUG (PROB-N)

Inventor: DEMUTH H; MCINTOSH C H S; PAULY R P; PEDERSON R A; ROSCHE F; SCHMIDT J; MCLINTOSH C H

Number of Countries: 032 Number of Patents: 018

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19616486	A1	19971030	DE 1016486	A	19960425	199749 B
WO 9740832	A1	19971106	WO 97DE820	A	19970424	199750
AU 9730233	A	19971119	AU 9730233	A	19970424	199812
EP 896538	A1	19990217	EP 97924866	A	19970424	199912
			WO 97DE820	A	19970424	
DE 19616486	C2	19990812	DE 1016486	A	19960425	199936
CN 1216468	A	19990512	CN 97194017	A	19970424	199937
NZ 332707	A	19991028	NZ 332707	A	19970424	199953
			WO 97DE820	A	19970424	
AU 721477	B	20000706	AU 9730233	A	19970424	200038
MX 9808143	A1	19990601	MX 988143	A	19981002	200058
EP 1084705	A2	20010321	EP 97924866	A	19970424	200117
			EP 2000119496	A	19970424	
KR 2000064559	A	20001106	WO 97DE820	A	19970424	200128
			KR 98707018	A	19980907	
EP 896538	B1	20010704	EP 97924866	A	19970424	200138
			WO 97DE820	A	19970424	
			EP 2000119496	A	19970424	
DE 59703959	G	20010809	DE 503959	A	19970424	200147
			EP 97924866	A	19970424	
			WO 97DE820	A	19970424	
JP 2001510442	W	20010731	JP 97538453	A	19970424	200148
			WO 97DE820	A	19970424	
ES 2158562	T3	20010901	EP 97924866	A	19970424	200161
US 6303661	B1	20011016	WO 97DE820	A	19970424	200164
			US 98155833	A	19981006	
RU 2189233	C2	20020920	WO 97DE820	A	19970424	200277
			RU 98121213	A	19970424	
MX 212246	B	20021218	WO 97DE820	A	19970424	200413
			MX 988143	A	19981002	

Priority Applications (No Type Date): DE 1016486 A 19960425

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

DE 19616486 A1 7 A61K-039/395

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 9740832 A1 G 21 A61K-031/425  
 Designated States (National): AU CA CN JP KR MX NZ RU US  
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC  
 NL PT SE

AU 9730233 A A61K-031/425 Based on patent WO 9740832  
 EP 896538 A1 G A61K-031/425 Based on patent WO 9740832  
 Designated States (Regional): AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LT LU LV MC NL PT RO SE SI

DE 19616486 C2 A61K-045/00  
 CN 1216468 A A61K-031/425  
 NZ 332707 A A61K-031/425 Based on patent WO 9740832  
 AU 721477 B A61K-031/425 Previous Publ. patent AU 9730233  
 Based on patent WO 9740832

MX 9808143 A1 A61K-031/425  
EP 1084705 A2 G A61K-031/425 Div ex application EP 97924866  
 Div ex patent EP 896538  
 Designated States (Regional): AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LT LU LV MC NL PT RO SE SI

KR 2000064559 A A61K-031/425  
 EP 896538 B1 G A61K-031/425 Related to application EP 2000119496  
 Related to patent EP 1084705  
 Based on patent WO 9740832

Designated States (Regional): AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LT LU LV MC NL PT RO SE SI

DE 59703959 G A61K-031/425 Based on patent EP 896538  
 Based on patent WO 9740832

JP 2001510442 W 19 A61K-038/46 Based on patent WO 9740832  
 ES 2158562 T3 A61K-031/425 Based on patent EP 896538  
 US 6303661 B1 A61K-038/48 Based on patent WO 9740832  
 RU 2189233 C2 A61K-031/425 Based on patent WO 9740832  
 MX 212246 B A61K-031/425

Abstract (Basic): DE 19616486 A

Use of ''effectors'' of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) activity  
 for lowering the blood sugar level below the glucose concentration  
 characteristic of hyperglycaemia in the serum of a mammal is new.

USE - Used for preventing or ameliorating ''pathological metabolic  
 anomalies of the mammalian organism'' selected from glucosuria,  
 hyperlipidaemia, metabolic acidosis and diabetes mellitus.

Dwg.0/3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 084 705 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
21.03.2001 Patentblatt 2001/12

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61K 31/425**

(21) Anmeldenummer: 00119496.8

(22) Anmeldetag: 24.04.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV RO SI**

(30) Priorität: 25.04.1996 DE 19616486

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
97924866.3 / 0 896 538

(71) Anmelder:  
**Probiobio Gesellschaft für  
Arzneimittelforschung mbH  
06120 Halle/Saale (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Demuth, Hans-Ulrich  
06114 Halle (DE)**  
• **Rosche, Fred  
06184 Drieskau (DE)**

- **Schmidt, Jörn  
06114 Halle (DE)**
- **Pauly, Robert P.  
Vancouver, B.C. V6T 2B8 (CA)**
- **McIntosh, Christopher H.S.  
Vancouver, B.C. V6T 1T7 (CA)**
- **Pederson, Ray A.  
Vancouver, B.C. V6S 1K9 (CA)**

(74) Vertreter:  
**Forstmeyer, Dietmar, Dr. rer. nat., Dipl.-Chem. et  
al  
Boeters & Bauer,  
Bereiteranger 15  
81541 München (DE)**

### Bemerkungen:

Diese Anmeldung ist am 18 - 09 - 2000 als  
Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62  
erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

### (54) Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels in Säugern

(57) Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>)(o.a. GLP-1<sub>7-37</sub> oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die

für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, *Diabetes mellitus*, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

**EP 1 084 705 A2**

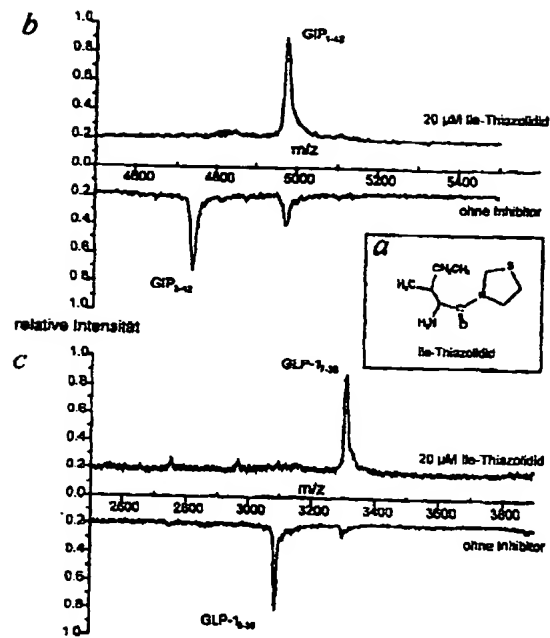


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP<sub>1-11</sub> (b) und GLP<sub>1-36</sub> und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden *Effektoren* (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

**[0002]** Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. und BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Vital Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 (1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖNE, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

**[0003]** Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidasen. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolinhaltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophillin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in

die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., *FEBS-Letters* 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., *J. of Immunology* 144, 2908 (1990)].

**[0004]** Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alanin-haltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

**[0005]** DL IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

**[0006]** Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>). Hormone, die die Glukoseinduzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine*), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

**[0007]** Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate *in vivo* kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion

bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. *Peptides* 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the inulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 296, 6275 (1994)].

**[0008]** Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i.v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

**[0009]** Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhanscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. *Sci. Americ.* 273 (1) 40-46 (1995)].

**[0010]** Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S.,

CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. *Bioorg. Medicinal Chem. Letters* 5 (23) 2897 (1995)].

**[0011]** Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP<sub>1-42</sub> und GLP-17-36 (o.a. GLP-17-37 oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

**[0012]** Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) zur Folge hat. d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.

2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.

3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in nachfolgender Veränderung der Glukoseinduzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulation des Blutglukosespiegels führt.

**[0013]** Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase VI (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität. Zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säugern der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidaemie, metabolischer Azidosen und Diabetes Mellitus. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektes der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität ver-



abreicht.

[0014] In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-Analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

[0015] Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptid-derivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur beschriebenen Methoden herstellbar.

[0016] Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

[0017] Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

[0018] In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1: Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Incretine GIP<sub>1-42</sub> und GLP-1<sub>7-36</sub> *in situ*

[0019] Sowohl *in vitro* mit gereinigtem Enzym als auch *in situ*, z.B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Incretine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

[0020] Erfindungsgemäß erreicht man *in situ* bei Inkubation von 30 µM GIP<sub>1-42</sub> bzw. 30 µM GLP-1<sub>7-36</sub> und 20 µM Isoleucyl-Thiazolidid (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20 %-igem Serum bei pH 7.6 und 30 °C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP<sub>1-42</sub> (5 µM) und synthetisches GLP-1<sub>7-36</sub> (15 µM) wurden mit humanem Serum (20 %) in 0.1 mM TRICINE Puffer bei pH 7.6 und 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für GIP<sub>1-42</sub> 2.5 pmol und im Falle von GLP-1<sub>7-36</sub> 7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix cokrystallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

[0021] (1b) Die Signale im Bereich von *m/z* 4980.1 ± 5.3 entsprechen GIP<sub>1-42</sub> (*M* 4975.6) und *m/z* 4745.2 ± 5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GIP<sub>3-42</sub> (*M* 4740.4).

[0022] (1c) Die Signale *m/z* 3325.0 ± 1.2 entsprechen GLP-1<sub>7-36</sub> (*M* 3297.7) und *m/z* 3116.7 ± 1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GLP-1<sub>9-36</sub> (*M* 3089.6).

[0023] In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Incretine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

##### Beispiel 2: Inhibierung des Abbaus von GLP-1<sub>7-36</sub> durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

[0024] Verfolgt man den Metabolismus der nativen Incretine (hier GLP-1<sub>7-36</sub>) im Serum der Ratte in Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (i.v. Injektion einer 1.5 µM Inhibitorlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren (n = 5) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulinotropen Peptidhormons GLP-1<sub>7-36</sub> zu beobachten (Abb. 2).

[0025] Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger i.v.-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere i.v. 50 - 100 pM <sup>125</sup>I-GLP-1<sub>7-36</sub> (spezifische Aktivität ca. 1 µCi/pM). Blutproben wurden nach 2 - 5 min entnommen und das Plasma mittels 20 % Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem γ-Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (counts per minute relativ zum Maximum angegeben).

##### Beispiel 3: Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i.v. Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

[0026] An der durch intraduodenale (i.d.) Injektion

Glukose-stimulierten Ratte, kann durch *i.v.* Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukosespiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die *i.v.* Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den *i.d.* Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung.

[0027] Abbildung 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparameter: A - DP IV-Aktivität, B - Plasma-Insulinspiegel, C - Blutglukosespiegel.

[0028] Die Versuchstiere (n = 5, männliche Wistar-Ratten, 200-225 g) erhielten als Initialdosis 1.5 µM Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9 %-iger Kochsalzlösung (▲) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor (■) (Kontrollgruppe n = 5). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75 µM/min über 30 min Versuchszeit (\*). Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitor-freie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt t=0 erhielten die Tiere *i.d.* eine Glukosedosis von 1g/kg 40%-iger Dextroselösung (w/v).

[0029] Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen. Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

[0030] Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. & BROWN, J.C. *Reg. Peptides*, 3, 53-63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

#### Patentansprüche

1. Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und *Diabetes mellitus* dient.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.

4. Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

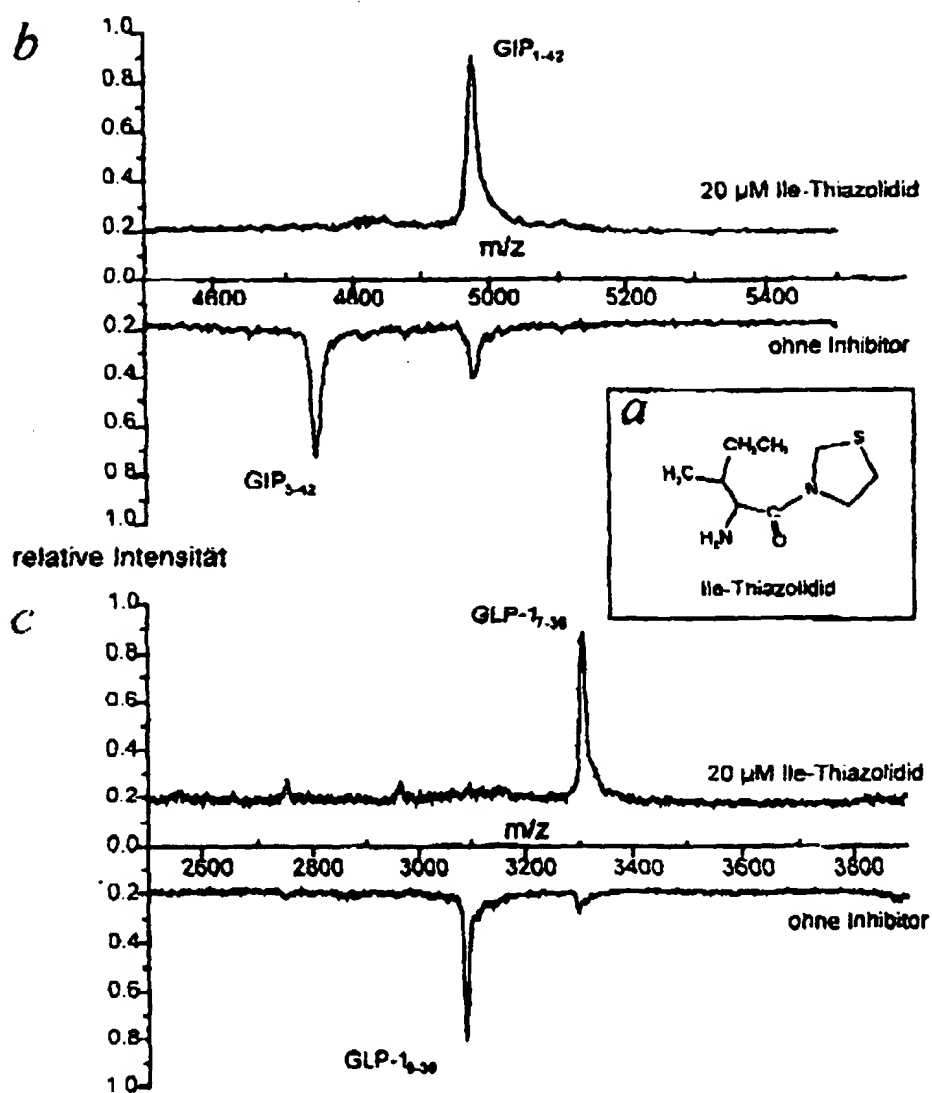


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP<sub>1-42</sub> (b) und GLP<sub>1-36</sub> und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

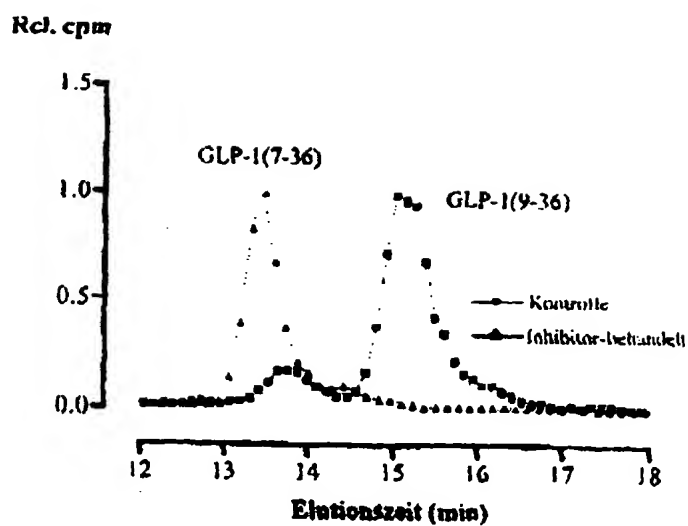


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

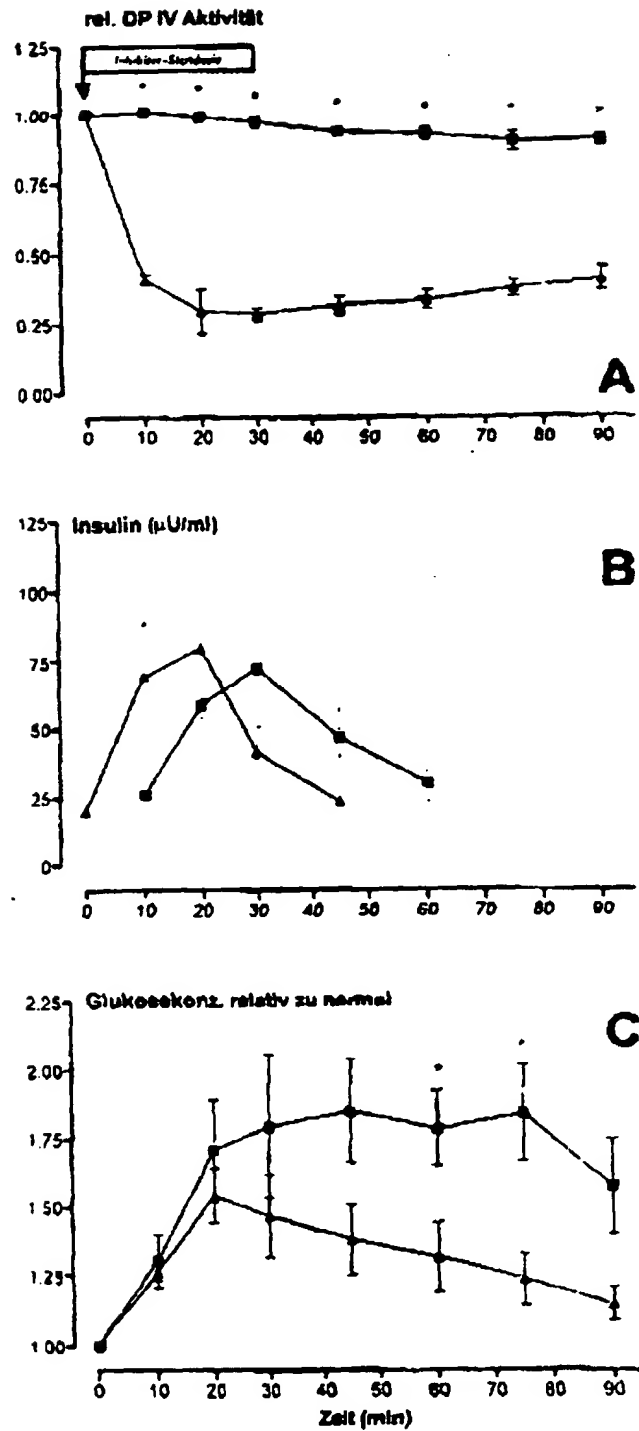


Abb. 3: Einfluß des DP IV-Inhibitors Isolecuyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der i.d.-Glukose-stimulierten Rane.

THIS PAGE BLANK (USPTO)